

Área de submissão: Ecologia

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E COMPOSIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA ARISTOLOCHIACEAE

Thomazia de Oliveira Emiliano¹, Angeline Maria da Silva Santos², Leonardo Pessoa Felix³

¹Universidade Federal da Paraíba – UFPB/Campus II, Areia-PB, e-mail: thomaziad@gmail.com

²Bolsista DCR (CNPq/Fapesq), Universidade Federal da Paraíba, UFPB/Campus II, Areia – PB, e-mail: angelinemssantos@gmail.com

³Laboratório de Citogenética e Taxonomia Vegetal, Departamento de Biociências, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia-PB, e-mail: lpfelix2@gmail.com

RESUMO

As espécies da família Aristolochiaceae ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Apresentam características marcantes, como a presença de flores com simetria irregular. É distribuída em oito gêneros e cerca de 624 espécies, dentre elas 30 espécies de ocorrência no Nordeste brasileiro. O número cromossômico básico proposto para *Aristolochia* é $x = 7$, com variações no número cromossômico. O objetivo do trabalho é determinar o número cromossômico e a composição e localização da heterocromatina em espécies pertencentes a família Aristolochiaceae através do bandeamento cromossômico com os fluorocromos CMA/DAPI. Para análise cromossômica, pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8Hq por 24 h a 10°C, posteriormente, fixadas em Carnoy e as lâminas preparadas pelo método do esmagamento em ácido acético 60%. As lâminas foram coradas com os fluorocromos CMA/DAPI e as melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss. Foram analisadas duas espécies de Aristolochiaceae: *A. gigantea* Mart. e *Aristolochia* sp., ambas as espécies apresentaram número cromossômico correspondente a $2n = 14$. A composição da heterocromatina foi composta por ricas regiões de GC. Em *A. gigantea*, foi observado quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ nas regiões terminais dos cromossomos. Já em *Aristolochia* sp., observou-se quatro bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ e duas bandas CMA⁺/DAPI⁰ na região pericentromérica dos cromossomos. Assim, este estudo mostra o número básico $x = 7$ é frequente em estudos citogenéticos de outras espécies do gênero e a análise citogenética de mais espécies da família Aristolochiaceae proporcionará o melhor entendimento sobre a sua variação cromossômica e suas relações evolutivas e filogenéticas.

PALAVRAS-CHAVE: *Aristolochia*, Heterocromatina, Número cromossômico

1. INTRODUÇÃO

A família Aristolochiaceae está presente em diversos lugares do planeta, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, como é o caso do Brasil, Haiti e República Dominicana, apresentando características marcantes (FERNANDES et al., 2021). A

família apresenta oito gêneros e cerca de 624 espécies (THE PLANT LIST, 2022), apresentando maior diversidade em regiões tropicais. As plantas desta família apresentam características morfológicas distintas e visualmente marcantes, em razão, principalmente, do formato de suas flores, com simetria irregular, sendo um atrativo visual.

No Brasil, está presente de Norte a Sul do país, com presença nos estados de Mato Grosso de Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Espírito Santo, São Paulo, como nas regiões Norte e Nordeste (CAPELLARI-JÚNIOR, 2002). No Nordeste, ocorrem cerca de 30 espécies, que ocupam a Caatinga, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Cerrado (BFG, 2018). Apesar de sua diversidade no território Nacional, é na Mata Atlântica em que se concentram o maior número de espécies de Aristolochiaceae, contabilizando 49 (REBOUÇAS et al., 2020).

Filogeneticamente, a família é considerada monofilética, onde estudos moleculares anteriores de *Aristolochia* s.l. usando o gene matK do cloroplasto para cerca de 60 espécies revelou que o gênero é monofilético, e inclui duas linhagens e várias sublinhagens (MURATA et al., 2001). Os resultados foram quase congruentes com a classificação de Gonzalez (1999), mostrando a monofilia dos dois subgêneros *Aristolochia* e *Siphisia*, e a monofilia da maioria das seções, subseções, e séries no subgênero anterior.

O número cromossômico é um caractere valioso para caracterizar clados em *Aristolochia* s.l. Sugawara et al. (2001) mostraram que a distribuição do número cromossômico também corrobora com o sistema de Gonzalez (1999). De acordo com Grant (1982), o número básico em *Aristolochia* deve ser $x = 7$, com variação no número cromossômico atualmente conhecido é muito maior do que antes ($2n = 6, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 28, 32, \text{ e } 36$) e a distribuição desses números na árvore filogenética é bastante complexa (OHI-TOMA et al., 2006). O subgênero *Aristolochia* apresenta uma diversidade de números de cromossomos, com $2n = 12, 14$ ou 16 .

A utilização de técnicas como bandeamento cromossômico tem sido útil para obtenção de dados sobre o cariótipo, ajudando a esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies. Diante disso, o objetivo do trabalho é determinar o número cromossômico e a composição e localização da heterocromatina em espécies pertencentes a família Aristolochiaceae através do bandeamento cromossômico com os fluorocromos CMA/DAPI.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Para análise cromossômica, pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8Hq por 24 h a 10°C, posteriormente, fixadas em Carnoy (3:1 etanol: ácido acético) por 2h em temperatura ambiente e depois armazenadas em freezer à -20°C. As raízes foram

lavadas em água destilada por cinco minutos e adicionou-se solução enzimática contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma), por 1h na estufa à 37°C. Posteriormente, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em ácido acético 60%, a lamínula retirada em nitrogênio líquido, secas à temperatura ambiente e envelhecidas por no mínimo três dias (GUERRA & SOUZA, 2002).

2.2 BANDEAMENTO COM FLUOROCROMOS CMA/DAPI

O protocolo para coloração com fluorocromos é o descrito por Carvalho et al. (2005) com adaptações. Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA (0,1 mg/ml) em câmara escura no período de uma hora, em seguida foi realizada a retirada das lamínulas com um jato de água destilada e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram coradas e montadas com 10µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol - 2 µg/ml) com meio de montagem tampão McIlvaine (pH 7,0). As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision 4.8.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas duas espécies pertencentes a família Aristolochiaceae: *A. gigantea* Mart. e *Aristolochia* sp. Ambas espécies apresentaram número cromossômico com $2n = 14$, corroborando com registros prévios da literatura (Figura 1). Embora Grant (1982) suponha que o número cromossômico básico para *Aristolochia* $x = 7$ seja improvável, neste estudo mostra que esse número básico é provável e é frequente em estudos citogenéticos de outras espécies do gênero (CCDB, 2022).

A composição da heterocromatina encontrada é composta por regiões ricas em GC. Em *A. gigantea*, foi observado quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ nas regiões terminais dos cromossomos. Já em *Aristolochia* sp., observou-se quatro bandas terminais CMA⁺/DAPI⁻ e duas bandas CMA⁺/DAPI⁰ na região pericentromérica dos cromossomos. A caracterização das bandas heterocromáticas, evidenciando a composição e localização, podem auxiliar na diferenciação entre citótipos com números cromossômicos estáveis (CORDEIRO et al., 2020), como ocorre em Aristolochiaceae. Em estudos realizados por Berjano et al. (2009) em espécies de Aristolochiaceae, observaram números cromossômicos com $2n = 12, 14, 32$ e 34 , com regiões heterocromáticas ricas em GC e AT. Ainda segundo os autores, em espécies pertencentes ao subgênero *Aristolochia*, as mudanças na morfologia e o número de cromossômico, bem como na heterocromatina, evidencia diferentes graus de diversificação do genoma entre espécies deste grupo.

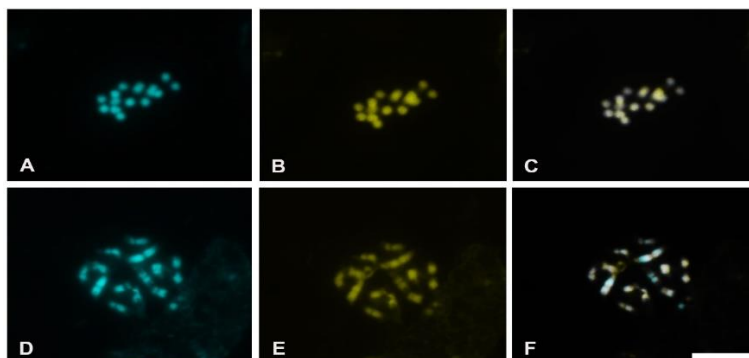


Figura 1. Células mitóticas de espécies pertencentes à família Aristolochiaceae. **A – C:** *A. gigantea*; **D – F:** *Aristolochia* sp., ambas com número cromossômico $2n = 14$. Barra em F corresponde a $10\mu\text{m}$.

4. CONCLUSÕES

O número cromossômico para as espécies analisadas foi $2n = 14$ e a composição heterocromática composta por regiões ricas em GC, com predominância de bandas heterocromáticas CMA⁺. A análise citogenética de mais espécies da família Aristolochiaceae proporcionará o melhor entendimento a sua variação cromossômica e suas relações evolutivas e filogenéticas.

REFERÊNCIAS

BFG - The Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2020.

BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, p. 219-227, 2009.

CAPELLARI JÚNIOR, L. Aristolochiaceae. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo** 2, p. 39-49, 2002.

CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, p. 276–282, 2005.

CCDB. **Chromosome Counts Database**. Disponível em: < <http://ccdb.tau.ac.il/home/>>. Acesso: 20 de junho de 2022.



CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, L. G.; FELIX, L. P. Heterochromatin and numeric chromosome evolution in Bignoniaceae, with emphasis on the Neotropical clade *Tabebuia* alliance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, e2018017, 2020.

FERNANDES, J. M.; SILVA, D. F.; LOPES, C. R. A. S.; DE ALMEIDA, A. A. S. D.; BRAGA, J. M. A.; FREITAS, J.; GONZÁLEZ, F. Contribuição à taxonomia do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) no Estado de Mato Grosso, com uma nova ocorrência para o Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e518101018676-e518101018676, 2021.

GONZÁLEZ, F. Inflorescence morphology and the systematics of Aristolochiaceae. **Systematics and Geography of Plants**, v. 68, p. 159–172, 1999.

GRANT, V. Periodicities in the chromosome numbers of the angiosperms. **Botanical Gazette**, v. 143, p. 379–389, 1982.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Recife: Funpec, 2002. 131p. 9

MURATA, J.; OHI, T.; WU, S.; DARNAEDI, D.; SUGAWARA, T.; SUGAWARA, T.; NAKANISHI, H. M. Molecular phylogeny of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) inferred from *matK* sequences. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 52, p. 75–83, 2001.

OHI-TOMA T, SUGAWARA, T.; MURATA, H.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; MURATA, J. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, v. 31, p. 481–492, 2006.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso: 13 de junho de 2022.

REBOUÇAS, N. C.; LIMA, I. G.; RIBEIRO, R. D. T. M.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Aristolochiaceae ss. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

SUGAWARA, T.; MURATA, J.; WU, S.; OHI, T.; NAKANISHI, T.; MURATA, H. A cytological analysis of 24 taxa in *Aristolochia* subgenera *Siphisia* and *Aristolochia* (Aristolochiaceae). **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 52, p. 149–158, 2001.